

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-219849

(43)公開日 平成 5 年(1993) 8 月31日

(51)Int.Cl.⁵

A 0 1 H 4/00

識別記号

庁内整理番号

8502-2B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平3-112685

(22)出願日 平成 3 年(1991) 2 月22日

(71)出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社
東京都品川区東品川 4 丁目12番62号

(72)発明者 加藤 紀夫

栃木県小山市大字出井1900日本たばこ産業
株式会社植物開発研究所内

(72)発明者 岩井 純夫

栃木県小山市大字出井1900日本たばこ産業
株式会社植物開発研究所内

(54)【発明の名称】 ウリ類における半数体植物作出方法

(57)【要約】

【目的】本発明の目的は、作業効率が高いウリ類における半数体植物作出方法を提供せんとするものである。

【構成】偽受精胚珠を胎座をつけて摘出し、組織培養培地に置床して培養することを特徴とするウリ類における半数体植物作出方法および組織培養培地にサイトカイニンを含有することを特徴とする前記ウリ類における半数体植物作出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 偽受精胚珠を胎座をつけて摘出し、組織培養培地に置床して培養することを特徴とするウリ類における半数体植物作出方法。

【請求項2】 組織培養培地にサイトカイニンを含むことを特徴とする請求項1記載のウリ類における半数体植物作出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ウリ類における半数体植物作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウリ類における半数体植物作出方法については、既に、Sautonらの報告が、「Agronomie 7(2)」1987年、141～148頁及び「Scientia Horticulturae 35」1988年、71～75頁に記載されている。

【0003】これらの刊行物に記載された従来の半数体植物作出方法の概要は、次の通りである。まず、メロンの花粉にガンマー線を照射し、花粉を不活化させた後、その不活化花粉を柱頭に付け、柱頭の下方向にある胚珠まで花粉管が伸びることによって偽受精胚珠をつくる。次に、この偽受精胚珠を摘出して、組織培養培地(E20A培地)に置床し、培養して胚様体を経て、半数体植物を作出するものである。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記の従来方法において、偽受精胚珠又は偽受精胚珠内の胚を取り出す作業に非常に時間がかかり、実用上の障害となっていた。

【0005】発明者らは、従来技術のかかる課題を解決するために鋭意検討した結果、驚くべきことに、偽受精胚珠を取り出さずに、胎座を付けて摘出し、組織培養培地に置床して培養することによっても半数体植物を作出できるという知見を得た。

【0006】さらに、すべての品種において、胎座を付けて摘出するやり方で半数体植物の作出率を向上させるためには、組織培養培地にサイトカイニンを含むことが有効であるとの知見を得た。

【0007】本発明は、かかる知見に基づきさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至ったものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、偽受精胚珠を胎座をつけて摘出し、組織培養培地に置床して培養することを特徴とするウリ類における半数体植物作出方法を要旨とするものである。

【0009】本発明は、さらに、上記ウリ類における半数体植物作出方法において、組織培養培地にサイトカイニンを含むことを要旨とするものである。

【0010】上記本発明方法の「偽受精胚珠」とは、放射線の照射によって不活化された花粉を柱頭に付けるこ

とによって、柱頭に花粉管が伸び、その下方にある胚珠に到達し、偽受精の状態になった胚珠のことである。

【0011】花粉の不活化とは、花粉管発芽能力を保持するものの、通常の雄性配偶子としての遺伝情報伝達機能を失活した状態をいい、次の処理を行って得られるものである。まず、葯が裂開し花粉が放出されているか、裂開直前の葯を有する花を採取する。次に、これらの花の花弁及び萼を基部からピンセット等を用いて除去し、葯を露出させた花を上向きに、底に脱脂綿を敷いたシャーレに並べた。この状態で放射線を照射する。放射線は、好ましくは、ガンマー線、X線である。例えば、X線の場合その照射量は、30キロレントゲン以上、さらに好ましくは80～100キロレントゲンである。

【0012】不活化した花粉を、あらかじめ雄ずい除去と袋掛け操作により他の花粉により受粉しない状態にしてあった両性花あるいは雌花の柱頭に、一本当たり2～4花分、受粉する。

【0013】このようにして得られた偽受精胚珠を胎座のまま摘出する。胎座とは、胚珠が心皮に着生する場所のことである。通常胎座には、400～700個の胚珠が存在するので、胎座を必要に応じて幾つかに分割して摘出する。また、胎座とともに、その外側にある子房壁をも付けたままで摘出しても差し支えない。胎座の厚さは、5mm以下とするのが望ましい。胎座を摘出する時期は、受粉操作から5～12日後である。

【0014】摘出した胎座を組織培養培地に置床する。組織培養培地としては、E20A培地、MS培地、B5培地、N6培地などが挙げられる。これらの組織培養培地には、IAA、サイトカイニンなどの植物生長調節物質を含むことができる。ウリ類の特定の品種において、胎座のまま摘出した場合に、胚様体の発生率が低下するが、サイトカイニンを含む組織培養培地を用いると、胚様体の発生率が増大する。サイトカイニンは、例えば、ゼアチン、カイネチン、ベンジルアデニンなどである。

【0015】

【作用】胎座のまま偽受精胚珠を摘出することは、作業能率を著しく向上させる。また、組織培養培地にサイトカイニンを添加することは、胚様体の発生率を向上させる。

【0016】

【実施例】

実施例1

○供試品種

(1) 品種：マウリ(Cucumis melo var. conomon) × パードネスト(Cucumis melo var. reticulatus)のF1品種

(2) 品種：アールスフェボリット(Cucumis melo var. reticulatus) × マウリ

(*Cucumis melo* var. *Conomelon*) のF1品種

【0017】○花粉不活化

葯が裂開し花粉が放出されている花を親株から採取した。これらの花の花弁及び萼を基部からピンセットで除去し、葯を露出させた花を上向きに、底に脱脂綿を敷いたシャーレに並べた。この状態で軟X線発生装置（オーミック社製）に入れ、100キロレントゲンの放射線を照射して、不活化した花粉を得た。

【0018】○柱頭への受粉

あらかじめ雄ずいの除去及び袋掛けの操作により、他の花粉が受粉できないような状態にしてあった両性花あるいは雌花の柱頭へ、一本当たり4花分の前記不活化した花粉を受粉させた。受粉による着果効率は、非照射花粉に比べて多少低い、受粉時の気温、時間などが適切であれば、80%程度の着果が可能であった。

E 2 0 A 培地の組成

*【0019】○胎座摘出の実際

受粉後、7日間経過した子房（果実）を親植物から採取した。採取した果実は、まず、果実表面に霧吹きを用いて70%アルコールを充分量噴霧し、キムワイプ紙で拭きとり、再度70%エチルアルコールを噴霧することにより殺菌した。殺菌処理後、カッターナイフを用い無菌的に偽受精胚珠を含んだ胎座を果実から切り出し、すみやかに調整済みの組織培養培地が入れてある管ビンに置床した。切り出す胎座の大きさは、底面積が5平方cm以下、厚さが5mm以下の片状となし、一果実当たり20片程度に分割した。

【0020】○組織培養培地の組成

使用したE 2 0 A培地の組成は、表1の通り。

【0021】

【表1】

| 成分 | 含有量(mg/リットル) | 成分 | 含有量(mg/リットル) |
|---|--------------|---|--------------|
| KNO ₃ | 2150 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 412 |
| NH ₄ NO ₃ | 1238 | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 313 |
| KH ₂ PO ₄ | 142 | Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O | 50 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 34 | NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 38 |
| KCl | 7 | FeSO ₄ · 7H ₂ O | 13.90 |
| Na ₂ EDTA | 18.65 | MnSO ₄ · H ₂ O | 22.130 |
| H ₃ BO ₃ | 3.150 | ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 3.625 |
| KI | 0.695 | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.188 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.016 | CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.016 |
| meso-inositol | 50.300 | pyridoxine | 5.500 |
| nicotinic acid | 0.700 | thiamine | 0.600 |
| calcium pantothenate | 0.500 | vitamin B12 | 0.030 |
| biotin | 0.005 | glycine | 0.100 |
| sucrose | 20 | agar | 10 |
| pH | 5.9 | | |

【0022】○置床後の培養条件及び日数

置床された胎座は、白色蛍光灯を光源とする2000lux、12時間日長の光条件で、室温27度（摂氏）で培養された。培養開始後10～60日の間に緑色の胚様体が出現した。

*【0023】○胚様体の発生数と発生率

培養した3個の果実を培養して得られた胚様体の発生数と発生率を表2に示す。

【0024】

【表2】

| 品 種 | 1 果実当たり 胚様体発生数 | 発生率 (%) |
|---------|-------------------|---------|
| (1) 品 種 | 4 | 0.8 |
| (1) 品 種 | 7 | 1.4 |
| (2) 品 種 | 7 | 1.4 |

注) 1 果実内の胚珠数を500個として発生率を算出した。

【0025】表2から明らかな通り、3個の果実から18個の胚様体を得られ、胚珠数当たりで換算した発生率は、1.2%であった。

【0026】従来方法において、偽受精胚珠又は偽受精胚珠内の胚を取り出す作業は、1果実当たり60分かかかるが、本発明方法の胎座を付けて摘出すれば、1果実当たり15分である。作業時間当たりの胚様体の発生率は、明らかに向上することが認められた。

【0027】実施例2

○供試品種

アンデスメロン

【0028】○花粉不活化、○柱頭への受粉、○胎座摘*

胚様体の発生数と発生率

* 出及び○置床後の培養条件及び日数については、実施例1と同様にした。

20 【0029】○組織培養培地の組成

表1に示したE20A培地に、IAAを1リットル当たり0.01mg加え、さらに、ベンジルアデニンを1リットル当たり無添加区、0.05mg添加区及び0.1mg添加区の3区とした。

【0030】○胚様体の発生数と発生率

3区で合計14個の果実を培養して得られた胚様体の発生数と発生率を表3に示す。

【0031】

【表3】

| ベンジルアデニン 添加量区分 | 胚様体発生数／果実数 | 発生率 (%) |
|-------------------|------------|---------|
| 無 添 加 | 2 / 6 | 0.07 |
| 0.05 | 6 / 4 | 0.30 |
| 0.1 | 12 / 4 | 0.60 |

注) 1 果実内の胚珠数を500個として発生率を算出した。

【0032】表3から明らかな通り、ベンジルアデニン無添加区より、0.05mg添加区及び0.1mg添加区における胚様体の発生率は明らかに向上した。

【0033】

※【発明の効果】本発明方法により、胚様体を得る作業効率は著しく向上し、特に、サイトカイニンを添加した組織培養培地では、胎座を付けて培養した場合、胚様体の

※50 発生率が低い品種においても、発生率を向上させること

ができる。

PAT-NO: JP405219849A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05219849 A
TITLE: METHOD FOR PREPARING HAPLOID
PLANT IN MELONS
PUBN-DATE: August 31, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

| NAME | COUNTRY |
|-------------|----------------|
|-------------|----------------|

| | |
|-------------|--|
| KATO, NORIO | |
|-------------|--|

| | |
|-------------|--|
| IWAI, SUMIO | |
|-------------|--|

ASSIGNEE-INFORMATION:

| NAME | COUNTRY |
|-------------|----------------|
|-------------|----------------|

| | |
|-------------------|-----|
| JAPAN TOBACCO INC | N/A |
|-------------------|-----|

APPL-NO: JP03112685
APPL-DATE: February 22, 1991

INT-CL (IPC): A01H004/00

US-CL-CURRENT: 435/69.1

ABSTRACT:

PURPOSE: To improve incidence of an embryoid even in a variety having low incidence of the embryoid and efficiently prepare a haploid plant in melons by picking out a pseudo-fertilization ovule to which a placenta is attached, putting the placenta in a cytokinin containing tissue culture

medium and culturing the ovule.

CONSTITUTION: Flowers in which anthers of melons (e.g. *Cucumis melo* var. *conomon*) are cleaved and opened and pollen is released are collected from a parent plant and petals and calyxes of these flowers are removed from the base with tweezers and these flowers having exposed anthers are arranged upward on a Petri dish laying an absorbent cotton in the bottom and put in soft X ray generator in this conditions and irradiated with radiation of 100K roentgen to afford inactivated pollen, which is then pollinated to a stigma of a bisexual flower or a female flower and ovaries passed for 7 days after pollination are collected and subjected to sterilization treatment and then a pseudo-fertilization ovule to which a placenta is attached is picked out with a cutter knife and the placenta is put in a tissue culture medium containing cytokinin and the ovule is cultured to prepare the objective haploid plant of melons.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio